

RECEIVED

OCT 31 2002

TECH CENTER 1600/2900

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants:

Klaus Unsicker, Jens Pohl, Michael Paulista and Rolf Bechtold

Application No.:

09/527,275

Group: 1646

Filed:

March 17, 2000

Examiner: O. Chernyshev

For:

Cytokines Having Neurotrophic Activity

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202

on 9/13/02 *[Signature]*

Date Signature

KLAUS UNSICKER

Typed or printed name of person signing certificate

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202

on 10/22/02 *[Signature]*

Date

Carol M. Bowerman

Carol M. Bowerman

Typed or printed name of person signing certificate

DECLARATION OF INVENTORS UNDER 37 C.F.R. § 1.131

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

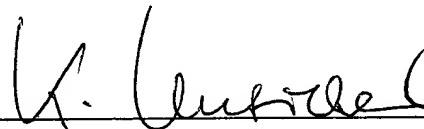
Sir:

We, Klaus Unsicker, a resident of Heidelberg, Germany, Jens Pohl, a resident of Hansbrücken, Germany, Michael Paulista, a resident of Leimen, Germany, and Rolf Bechtold, a resident of Heidelberg, Germany, declare that:

1. We are co-inventors of the above-referenced U. S. Patent Application.
2. We have read U. S. Patent Application No. 09/527,275 and the Office Action mailed from the United States Patent and Trademark Office September 14, 2001 and May 31, 2002.

3. We hereby state that the invention described and claimed in U.S. Patent Application No. 09/527,275 was completed in Germany, a World Trade Organization (WTO) member country, before June 5, 1997, the effective publication date of Louis, "Methods For Treating Photoreceptors Using Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Protein Product," WO 97/19694.
4. Completion is evidenced by the enclosed Exhibits A-C, which represent copies of laboratory notebook pages 269-280, 281 and 282-287, which demonstrate the following:
 - Exhibit A Pages 269-280 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of ciliar ganglion neurons (CG-Assay). This assay demonstrated the synergism of TGF- β with GDNF, which is also presented as Figure 6 in the present application.
 - Exhibit B Page 281 shows that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of paravertebral sympathetic neurons (Bio-Assay/SG-Assay). The combination of TGF- β and GDNF demonstrated a synergistic neurotropic effect on paravertebral sympathetic neurons.
 - Exhibit C Pages 282-287 show that the combination of TGF β 1 and GDNF was tested in a survival assay of sensoric spinal ganglion neurons (DRG-Assay). This assay demonstrated that the TGF- β and GDNF cytokine combination provided a synergistic neurotropic effect on dorsal root ganglion neurons.
5. In accordance with United States Patent and Trademark Office procedures, the dates recorded on these laboratory notebook pages have been redacted.

6. We further declare that all statements made herein of our own knowledge are true and that all statements made on information or belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under § 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements, if made, may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.



Klaus Unsicker

9/13/02

Date

Jens Pohl

10. Sept. 2002

Date

Michael Paulista

10. Sept. 2002

Date



Rolf Bechtold

10. Sept. 2002

Date

CG - Array: 2 Platten
Proben: $TGF\alpha 1$; $GDNF$; $TGF\alpha 1 + GDNF$; $F3$; VIP ; $VP + TGF\alpha 1$
 $F3 + TGF\alpha 1$; $F3 + GDNF$; $VP + GDNF$; siehe Protokoll
ca. 1100 Zellen / well

CG - Array: Stoppen der Platten mit Blutardialdehyd
(Montag geziert)

CG - Array: 2 Platten
Proben: $TGF\alpha 1$; $GDNF$; $TGF\alpha 1 + GDNF$; $F3$; VIP ; $F3 + GDNF$
 $VIP + GDNF$; $F3 + TGF\alpha 1$; $VIP + TGF\alpha 1$; siehe Protokoll
ca. 1200 Zellen / well

CF - Array: Stoppen der Platten mit Blutardialdehyd

B49: Überstand + Zellen vom 25.-06.
TCA-Fällig. 1.5 ml 200 ml PBS

+ TCA → Protein-Schutt → in Proteingitter aufgenommen

DF: 50 µl B49 Überstand bzw. Lyset + 50 µl DF-Schutt.
Je 2 µl N-glycosidase-F hinzun.
17 h bei 37 °C Inkubation

CG - Array: 1e Platte
Proben: VIP ; $F3$; $VIP + \alpha GDNF$; $VIP + \alpha TGF\alpha 1$; $\beta 3 + \alpha GDNF$
 $F3 + \alpha TGF\alpha 1$; $TGF\alpha 1 + GDNF$; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

EXHIBIT

A

Western - Blot

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B49	/	LMU	/	G1	G2	G3	/	6	W1DG	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
	/	LMU	/	G1	G2	G3	/	2	21DG	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$$U = 125V; \quad I_F = 70 \text{ mA}; \quad I_E = 32 \text{ mA}$$
$$t = 1h\ 15'$$

15' Äquilibrieren im Transferpuffer, NC-Membran + Gel

Blots: 15' = t, U = 9-12V, I = 0.22A

2-3' Ponceau-S
1h Block
1. AK

C6 - Array: Stoppen mit Glutaraldehyd

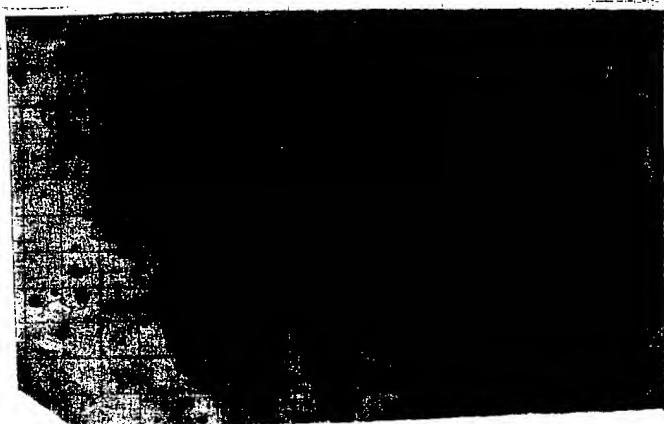
LF - Blot: 3×10^7 Wachen mit TTBS
2. AK (1:5000)

Chromaffine: 2 NN \rightarrow Platte \rightarrow Präparation siehe Protokoll
 $\rightarrow 178 \cdot 10^6$ Zellen \rightarrow 25 Flaschen
(1:5) $\rightarrow 1.4 \cdot 10^5$ Zellen / Flasche

U - Blot: 3×10^7 Wachen mit TTBS (PAGE v. 19.07.)
-: ECL

10

Überstand



Gel

Lysat

15'



3'



B49: Überstand + Zellen

Stimulations:

30 h → mit

- a) $10 \mu M$ Acetylcholin + $10 \mu M$ Esrin $n=10$
 - b) $50 \mu M$ Nicotin $n=5$
- ~~2~~ Kontrollen für b) 4 Kontrollen für a,

Durchführung: i) 2 ml Medium

- ii) 15' Stimulations → Medium (daron 1
 $2 \mu l$ Stabilisierungspuffer für APC)
- iii) 10' Lysis → H₂O

Prot 2
F3, VP, F3 + TGF β 1, GDNF, F3 + TGF β 1 + GDNF
VP + TGF β 1, VP + GDNF, + GDNF + TGF β 1, TGF β 1 + GDNF
TGF β 1 + GDNF; F3 + α GDNF, F3 + α TGF β 1, VP + α GDNF
VP + α TGF β 1; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Flutardialdehyd

CG-Assay: 2 Platten

Protein: GDNF, TGF β 1, FGF-2, WIF1 Kombinationen;
siehe 'Protokoll'

ca. 1200 Zellen / well

CB-Assay: Stoppen mit Flutardialdehyd

Chromaffine: 1 NN \rightarrow Mark \rightarrow Prop nach Protokoll
 \rightarrow 428.000 Zellen / CS $\rightarrow 8,56 \cdot 10^6$ Zellen
auf Cover slips ausgesät für EM
(ca. 2ml eingespritzt)

CB-Assay: 1 Platte
Protein: unbekannt (var. zu wenig)

CG-Assay: 2 Platten

Protein: F3, VP, α TGF β 1, α GDNF, TGF β 1, GDNF
D1-5, I1-3, II1+2, III1+2, IV1-3 ACA-Fractionen
siehe Protokoll
(ca. 1200 Zellen / well)

CG-Assay: Stoppen mit Blutarchidialdehyd

CG-Assay: 2e Platte
Proteine: D2+3, II₁, IV₁, F₃, GDNF, TGF_β1; nische Protokoll

Protein-Fällg: Aromattin vom 25.05. und vom 11.07.
Überstand nach Stimulierung und Lysat

Protokoll → 3000 rpm (Heraeus) für 30' → Überstand
Max. rpm (---) für ca. 1h → ---
10% TCA Endkonzentration → Vortex → für 1h (oder 1/2 h)
auf Eis → 4000 rpm (Heraeus) für 15' → Pellet
je 1ml Auton → 4000 rpm (Heraeus) für 15' →
je 1ml SMEDOH → 4000 rpm (---) für 15'

Pellet in Proteinpuffer aufnehmen (4-6 H Harzstoff)

CG-Assay: Stoppen mit Blutarchidialdehyd

SDS-PAGE : 15% Laemmli, red.

U=80+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Chr. 25.05.	/	LW	/	G1	G2	G3	/	0	lysat	/
-------------	---	----	---	----	----	----	---	---	-------	---

	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
--	---	---	---	----	----	----	---	----	----	---

Chr. 11.07.	/	LW	/	G1	G2	G3	/	0	lysat	/
-------------	---	----	---	----	----	----	---	---	-------	---

	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
--	---	---	---	----	----	----	---	----	----	---

U = 125V; I_A = 76mA; I_G = 35mA; t = 1h 20'

Aquilibrieren der NC-Membran + Fil für 15' in Transferpuff

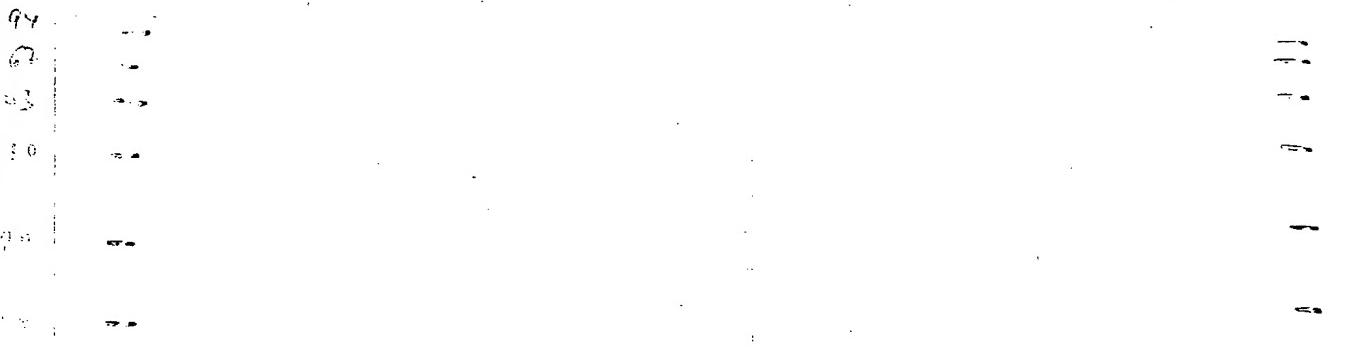
Blot: t = 15'; I = 0.22A; U = 9 - 12V

1h Block; 1. AK

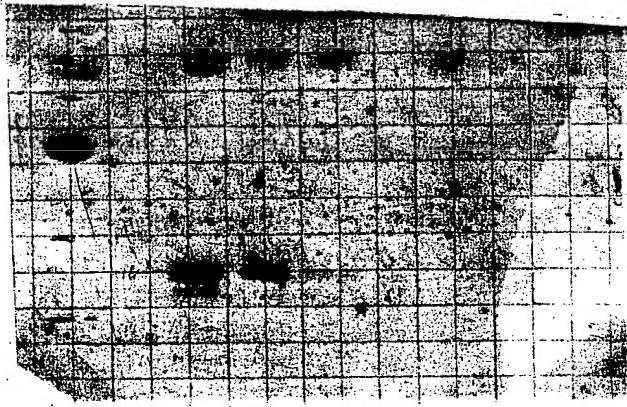
WT-Blot: 3×10^4 mit TTBS waschen ; 2 AK

Crom.: Präparation nach Protokoll ; 2 Nebenwirken
 $\rightarrow 176.25 \cdot 10^4$ Zellen $\rightarrow 1.175 \cdot 10^4$ Zellen / Flasche

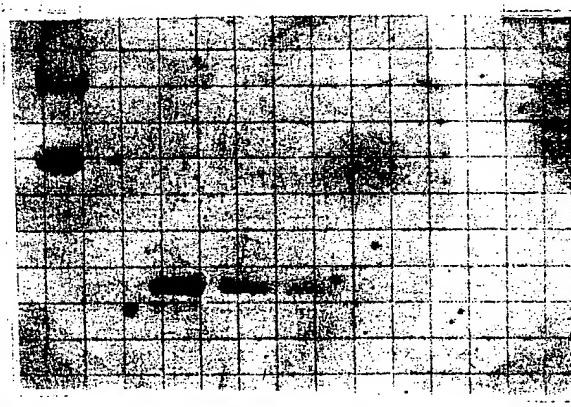
IF-Blot: 3×10^4 mit TTBS waschen \rightarrow ECL



25.05.



11.07.



1'

3'



Proben F3; TGF β 1; 6DNF; αTGF β ; GDNF; rot 2
Antragungen siehe Protokoll
ca. 1200 Zellen / well

Stimly: 30h → Stimulierung mit 10 μ M Acetylcholin + 10 μ M Esrin
(ca. 2:00 Uhr)

Medium: 2ml

Stimulierung: 2ml; davon 100 μ l + 2 μ l Stabilisierungs-
puffer für HPLC

15' = t

Lysis: 2ml H₂O ; t = 10' (+ Zellen)

CG-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay: 2 Platten

Proben: TGF β 1; 6DNF; Antragungen siehe Protokoll
ca. 1300 Zellen / well

CF-Assay: Stoppen mit Glutaraldehyd

Protein-Fällig.: Chromatine: lysat und Überstand nach Stimulierung.

- 30' bei 3000 rpm (Heraeus) → Überstand
- Maximale rpm (Heraeus) für ca. 1h → Überstand
- 10% TCA - Endkonzentration → Vortex → für 1h auf Eis
- 15' bei 4000 rpm (Heraeus) → Pellet
- je 1ml Autos → 15' bei 4000 rpm (Heraeus)
- je 1ml MeOH → --

Pellet in Proteinpuffer + ca. 618 M Harnstoff aufnehmen

CE Assay

SDS-PAGE : 15% T - Laemmli, red.

+
Western - Blot

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gel 1+2	/	LMH	/	61	62	63	64	65	66	/
	/	5	/	10	—	—	—	10	—	/

$t = 14 \text{ min}$

Western - Blot : 1. Amersham NC - Membrane
2. Bio Rad

15' Agarose gel
15' Blot ($I = 0.2 A$; $U = 12-18 V$)
60' Block
1. AK

CG - Array : CNT F + AK's
FB, VI + AK's Antragung siehe Protokoll
→ 4th!

CG - Array : Stoppen mit Glutaraldehyd

CG - Array : 2 Platten
G + T↓ und T + G↓ → Ausgang: 2n, 1ml
Antragung siehe Protokoll
Auswertung ---

CG - Array : Stoppen mit Glutaraldehyd

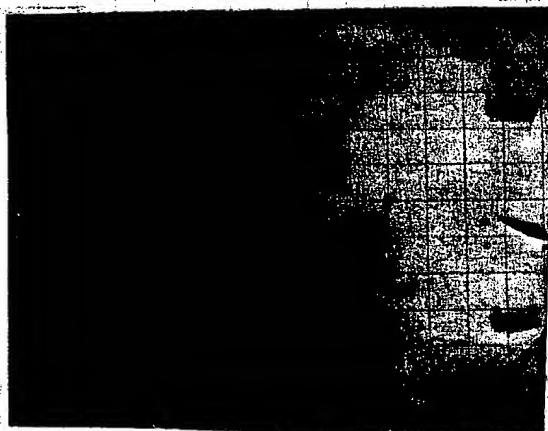
Western Blot : 3x Waschen für 10' mit TTBS
2. AK

Western Blot

$\times 10'$ Waschen mit TT
ECL

Amersham

Bio Rad



1'



3'

849: Litostanol \rightarrow Dielyc.

Chromaffine: Preparation und Aufarbeitung nach Protokoll
 $\rightarrow 21,5 \cdot 10^6$ Zellen

CG-Assay:

2 Platten

Proben: T+G↓ und G+T↓ (Ausgang: 2ug/ml)

Anfragerung und Auswertung siehe Protokoll

Chromaffine:
(3:00 uhr)

nach 306 Stimulierung mit $10\mu M$ Acetylcholin + $10\mu M$ Esr

Medium: 2ml

Stimulierung: 2ml (davon $100\mu l$ + $2\mu l$ Stabilisator
puffer für HPLC); $t = 15'$

Lysis: 2ml H₂O; $t = 10'$ / + Zellen $\Rightarrow -80^\circ C$

CG-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

CG-Assay:

2 Platten

Proben: CRTF, T3, V_i (+ Ak's)

Anfragerung + Auswertung siehe Protokoll

CG-Assay:

Stoppen mit Glutaraldehyd

SDS-PAGE

: 15% T - acrylamid, red.

Western Blot

1. NC - Membran Bio Rad
2. - - - Millipore

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Gel 1+2

/	LMW (b _{RF}) (RM)	/	G1	G2	G3	G4	G5	G6	/
/	5 (4)	/	10	<—————>				10	/

$t = 1h\ 15'$

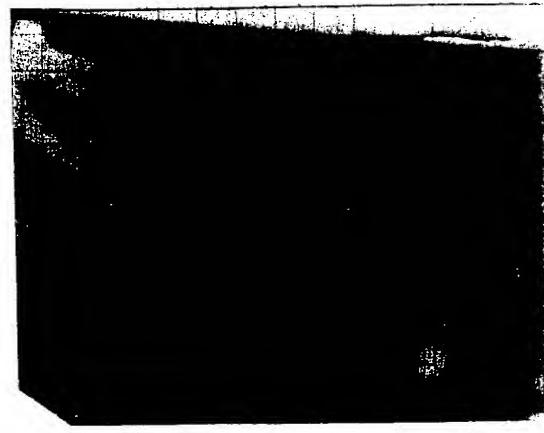
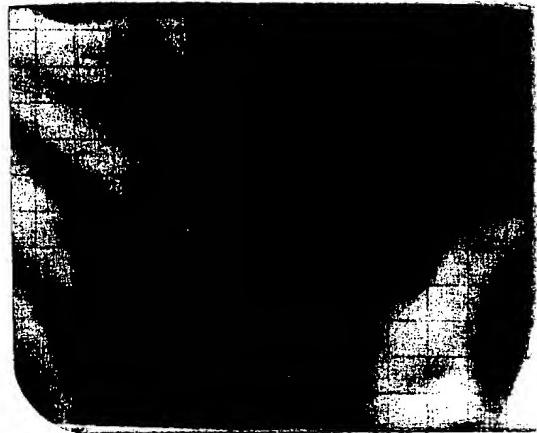
$U = 125V$

$Bst = 15^\circ C \leftarrow 15^\circ C$ equil.
 \downarrow
 $60^\circ C \rightarrow 1.1K$

44 Eason

listings
-2080

30 °C



(G - Antrag): versch. FCS - Themen (+ G-DVF)
Antragung + Auswertung sehr Protokoll

6 - Array: Stop on next find a child by id

Western Blot: 3×10^7 Viren mit TTBS
z. AK

APPENDIX E

Western Bisc

M³oT - laemmlie red.

1 NC - New Braun B. & K. C.
2. - - - Amherst

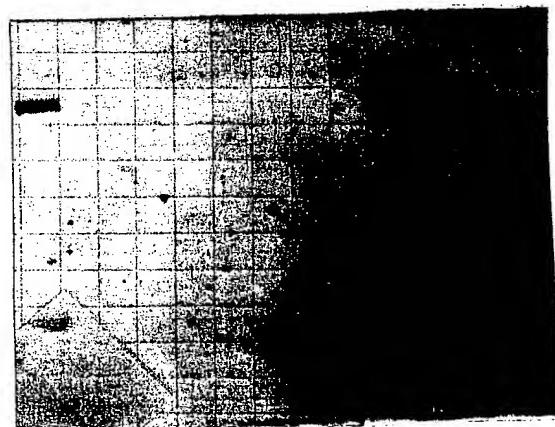
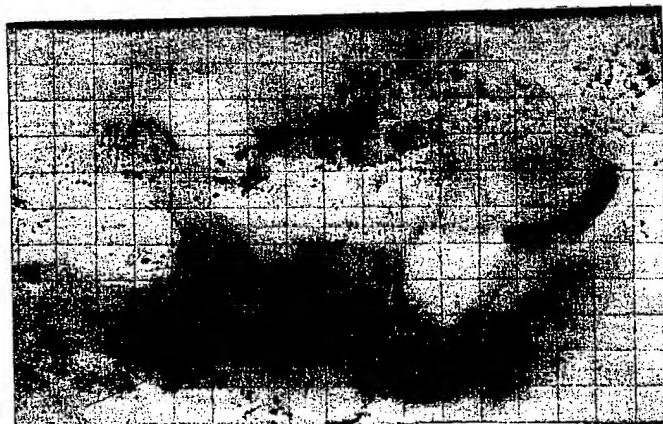
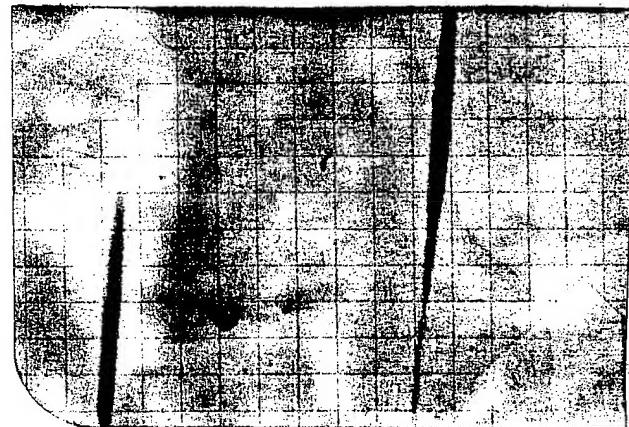
/ R / G1 G2 G3 G4 G 6.6 /

/ 4 / 10 ← 10 /

$t = 15'$ $U = 12.5V$

Bio Rad

Amesham



Blot: $t = 15'$; *Aquilibium*
 $t = 15'$; Blot
 $t = 60'$; Block
1 4K

$I = 0.2A$; $U = 12 - 18V$

Western Blot : 3x Waschen mit TTBS
i. 4K

Western Blot : 3x 10' Waschen mit TTBS

ECL

(G - Assay) :
A) "normal"
B) nach "MN - Behandl." 2 Platten

A) 127.500 zellen → 1275 Z/well
B) 262.500 " → MN - Beh. → 97.000

Antragung und Auswertung siehe Protokoll

(MN - Beh.: BSA - Kissen, Futterzamide, BSA - K., gassing)

MLEC - Assay : 1x Platte
Zellen ausgesät, 36 Std., Protein antragen
über Nacht ink.
Antragung und Auswertung siehe Protokoll

(G - Assay) : Stoppen mit fluktuendemdehydro

Western - Blot : 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

MLEC - Assay : 1x Waschen mit PBS
Lyse Puffer (100µl/well) für 2-3 h bei RT
80µl signal ablesen und messen - siehe Protokoll

Bio - Assay : CE E12 / SG E12 / SG E8
Proben: TGFβ1; GDNF; ~~WIF~~ siehe Protokoll

CE/E12: 155.000 zellen → 1290 zellen / well → Stop 12-09
SG/E12: 345.000 " → 3450 zellen / well → Stop 14-09
SG/E8: 132.500 " → 1950 zellen / well

EXHIBIT

SG : Stoppen mit Ouantaldehyde

CG : Stoppen mit Fluorodiaziddehyd

CG: FCS: verschiedene Chargen
TGF β 1 ; GDNF
165.000 Zellen \rightarrow 1375 Zellen/well
nicht Protokoll

Bio Assay: CG / DRG / SG : E12
↓ ↓ ↓
18-07 19-07 20-07 Stop
nicht Protokoll

CG: 155.000 Zellen \rightarrow 1290 }
DRG: 142.500 -- \rightarrow 1190 } Zellen/well
SG: 177.500 -- \rightarrow 1480 }

Proben: TGF β 1 ; GDNF

SDS-PAGE : 15% T Laemmli ; red.

Western Blot

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

/ RM / G1 G2 G3 F DG/F 63 /

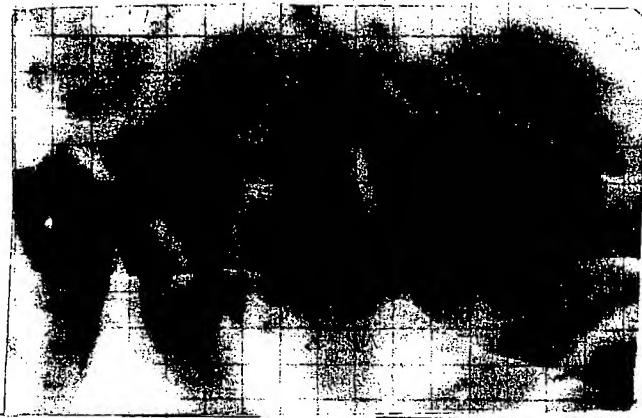
/ 4 / ← 10 → ← 20 → 10 /

$t = 1h 25'$ $U = 125V$ $I_T = 66mA$ $I_E = 33mA$

Blot : $t = 15'$ $t = 15'$ $t = 60'$ $t = 1h$ \rightarrow aquilibrieren
blotten Blockläng.
n. Ak $I = 0.2A$; $U = 16-19V$

EXHIBIT

2.5'



1'

CG: Stoppen mit Glutaraldehyd

Bio-Abzug: DRG / E8 → Stop 20-09 nicht Protokoll
CG / DRG / SG E12
↓ ↓ ↓
19-09 20-09 21-09 Stop -II-

DRG / E8: 160.000 Zellen → 1300 Zellen / well

CG / E12	100.000	-II-	→	1250	Zellen / well
DRG / E12	180.000	-II-	→	1125	
SG / E12	260.000	-II-	→	1300	

Western-Blot: 3x 10' Waschen mit TTBS
2. AK

Sio-Abzug: CG / DRG / SG E12
21-01 22-09 23-09 Stop nicht Protokoll
CG 100.000 Zellen → 1375 Zellen / well

SG 29.07.07 -/- → 1320 v Client/well

Western Blot: 3x Waschen je 10' mit TTBS
ECL

Bio - Assay: (2x) DRG / SG E8
25.07 26.07 Stop } siehe Protokoll

DRG : 332.500 Zellen → 1385 } Zellen/well
SG : 49.500 -/- → 830 }

Bio - Assay: CG / DRG E10
26.07 27.07 Stop }
DRG / E14 rat 27.07 Stop } siehe Protokoll

CG E10 135.000 Zellen → 1125 Zellen/well
DRG E10 79.968 -/- → 1176 -/-

DRG E14 rat 156.000 -/- → 1300 -/-

Bio - Assay: CG / DRG E10
28.07 29.07 Stop } siehe Protokoll

CG 125.000 Zellen → 1250 Zellen/well
DRG 135.000 -/- → 1350 -/-

Bio - Assay: CG / DRG / SG E8
08-10 09-10 10-10 Stop } siehe Protokoll

DRG: 125.000 → 1170 ∫ Zellen/L

SG: 80.000 → 1180

DE: 20% IFS + 20% FCS

20 µl Serum + 80 µl Probenpuffer + 2 µl F-Glycanase
17h bei 37°C inkubieren → Stop c1-10

SDS-PAGE : 15% T Laemmli, red

Western Blot

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RH	/	G1	G2	G3	/	IFS	DE IFS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/
/	RH	/	G1	G2	G3	/	FCS	DE FCS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/

$t = 1h\ 20'$ $U = 125V$ $I_A = 76mA$ $I_E = 39mA$

Slot:

$t = 15'$ Äquilibrium

$t = 15'$; $I = 0.2A$; $U = 13-17V$

$t = 60'$ Block

1. AK

Blot



FCS

14

3

1'

SG 225.000 Zellen \rightarrow 1400 Zellen/well

Western - Blot: 3x $10'$ mit TTBS waschen
2. AK

Western - Blot: 3x $10'$ mit TTBS waschen
ECL

Bio - Assay: SG / E12 nische Protokolle

SG: 270.000 Zellen \rightarrow 1350 Zellen/well
Stop: 14-10

Bio - Assay: CG / DR6 E8
15-10 16-10 stop nische Protokolle

CG: 152.500 Zellen \rightarrow 1270 } Zellen/well
DR6: 160.000 " " \rightarrow 1333 }

Bio - Assay: SG 1G8 \rightarrow Stop: 19-10 }

CG / DR6 / SG E10
17-10 18-10 19-10 Stop nische Protokolle

SG 1G8: 92.500 Zellen \rightarrow 1160 Zellen/well

CG DR6 SG	110.000	-"	\rightarrow	1100	} Zellen/well
	130.000	-"	\rightarrow	1080	
	115.000	-"	\rightarrow	1150	

Bio - Assay : CG / DRG / SG E8
 22-10 23-10 24-10 Stop nische Protokoll

CG	120.000	zellen	\rightarrow	1200	} zellen/well
DRG	100.000	-"	\rightarrow	1250	
SG	120.000	-"	\rightarrow	1200	

Bio - Assay : CG / DRG / SG E10
 24-10 25-10 26-10 Stop nische Protokoll
 nenne BSA
 \oplus = CNTF 10ng/ml

CG	100.000	zellen	\rightarrow	1250	} zellen/well
DRG	130.000	-"	\rightarrow	1300	
SG	175.000	-"	\rightarrow	1250	

Bio - Assay : CG / DRG / SG E12
 26-10 27-10 28-10 Stop nische Protokoll

CG :	75000	zellen	\rightarrow	1100	} zellen/well
DRG :	120.000	-"	\rightarrow	1200	
SG :	185.000	-"	\rightarrow	1520	

Bio - Assay : CG / DRG / SG E9
 31-10 1-11 2-11 Stop nische Protokoll

(G :	115.000	zellen	\rightarrow	1440	} zellen/well
DRG	125.000	-"	\rightarrow	1250	
SG	130.000	-"	\rightarrow	1300	

Bio - Assay : CG / DRG / SG E10
 1-11 2-11 3-11 Stop nische Protokoll

CG	110.000	zellen	\rightarrow	1250	} zellen/well
DRG	125.000	-"	\rightarrow	1250	
SG	120.000	-"	\rightarrow	1200	